

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
1 de Julio de 2004 (01.07.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2004/055520 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: G01N 33/68,  
33/576

(ES). SANTAMARIA MARTINEZ, Enrique [ES/ES];  
Pintor Paret nº5, 1º F, E-31001 Pamplona (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2003/000635

(74) Mandatario: PIQUERO GARCIA, Dolores; Barcelo  
nº15, 5º izda., E-28004 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:  
16 de Diciembre de 2003 (16.12.2003)

(81) Estados designados (*nacional*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P200202911  
18 de Diciembre de 2002 (18.12.2002) ES

(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo US*):  
ONE WAY LIVER GENOMICS, S.L. [ES/ES]; Barcelo  
nº15, 5º izda., E-28004 Madrid (ES).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): MATO DE  
LA PAZ, Jose, Maria [ES/ES]; Barcelo nº15, 5º izda.,  
E-28004 Madrid (ES). CORRALES IZQUIERDO, Fer-  
nando [ES/ES]; Pintor Paret nº5, 1º F, E-31008 Pamplona

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: METHOD OF DIAGNOSING NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH) USING MOLECULAR MARKERS

(54) Título: MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESTEATOHEPATITIS NO ALCOLHÓLICA (NASH) MEDIANTE EL  
EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES

(57) Abstract: The invention relates to a method of diagnosing non-alcoholic steatohepatitis (NASH) using molecular markers. The inventive method consists in detecting and quantifying, *in vitro* in a hepatic tissue sample, the levels of a protein which can be used as a NASH molecular marker and which is selected from apolipoprotein A1, sub-unit  $\beta$  of the mitochondrial ATPase, leukotriene A4 hydrolase, keratin 18, guanidine acetate N-methyltransferase, superoxide dismutase, albumin, antioxidant protein 2 (isoform 1), prohibitin 1, methionine adenosyl transferase, long-chain acyl CoA dehydrogenase, selenium binding protein, antioxidant protein 2 (isoform 2), and combinations of same. The invention further consists in comparing the results obtained with the normal values of said proteins in healthy hepatic tissue. Said method can be used to diagnose NASH and/or to assess a patient's potential risk of developing NASH.

(57) Resumen: Método que comprende detectar y cuantificar *in vitro*, en una muestra de tejido hepático, los niveles de una proteína, útil como marcador molecular de NASH, seleccionada entre apolipoproteína A1, subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, queratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina, proteína antioxidante 2 (isoforma 1), prohibitina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de unión al selenio, proteína antioxidante 2 (isoforma 2), y combinaciones de las mismas, y comparar los resultados obtenidos con los valores normales de dichas proteínas en tejido hepático sano. Dicho método permite diagnosticar NASH y/o evaluar el riesgo potencial de un sujeto a desarrollar NASH.

WO 2004/055520 A1

BEST AVAILABLE COPY

## **MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (NASH) MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES**

### **5 CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se relaciona, en general, con el diagnóstico de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), en particular, con el diagnóstico precoz de la predisposición de un sujeto a desarrollar dicha enfermedad o con la confirmación de que un sujeto padece dicha enfermedad, basado en la identificación de unos marcadores moleculares de dicha enfermedad y/o en el análisis de los perfiles de expresión en hígado de dichos marcadores moleculares de NASH.

### **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es una lesión aguda del hígado que se caracteriza por la aparición de necrosis, inflamación y fibrosis. La NASH y la esteatohepatitis alcohólica (ASH) son indistinguibles histológicamente y se piensa que tienen la misma etiología. En la actualidad se considera que la NASH es una enfermedad progresiva con un 25% de incidencia de cirrosis y un 10%-15% de incidencia de mortalidad. Además, se cree que es la causa de enfermedad hepática en la mayoría de los casos de cirrosis criptogenética (causa desconocida). Por tanto, el estudio de la NASH se ha convertido en uno de los temas prioritarios de la hepatología clínica. Una revisión de la NASH, su epidemiología, características, estrategias de diagnóstico y tratamiento ha sido elaborada por Andrea E. Reid [Reid A.E., Gastroenterology, 2001, 121:710-723].

Para hacerse una idea de la magnitud del problema, basta con indicar algunos datos epidemiológicos de la NASH:

- entre el 7% y el 11% de los pacientes que se someten a biopsia hepática en Estados Unidos y Canadá se detecta NASH;
- las mujeres representan entre el 60%-83% de los pacientes con NASH;
- alrededor del 30% de los pacientes obesos tienen NASH;
- la aparición de fibrosis se detecta en el 43% de los pacientes con NASH;
- la incidencia de cirrosis en pacientes con NASH es de aproximadamente el 25%;
- todos los pacientes que desarrollan cirrosis alcohólica (aproximadamente el 50%

de todas las cirrosis) han desarrollado previamente ASH; y

- la NASH es frecuente en los pacientes con hepatitis C.

Debido a esta posición prominente de la NASH entre las enfermedades crónicas y progresivas del hígado, existe un interés creciente en determinar su patogénesis. Sin embargo, los mecanismos patofisiológicos que conducen a la aparición de NASH no han sido aún determinados. Los alcohólicos pueden tener un hígado moderadamente graso durante muchos años y, sin ningún cambio en sus hábitos de bebida, desarrollar repentinamente hepatitis alcohólica aguda. Similarmente, la obesidad, la diabetes tipo 2 y la hipertrigliceridemia se asocian frecuentemente con la acumulación hepática de grasa y, aunque esta situación no conduce invariablemente a la aparición de lesiones necroinflamatorias, estos pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar NASH. Consecuentemente, se ha propuesto la existencia de factores ambientales o celulares que actúen como interruptores de una cascada de eventos moleculares que inducen necrosis, inflamación y fibrosis. Dos de estas posibles causas son la endotoxemia portal y la peroxidación lipídica. Asimismo se han identificado alteraciones en la expresión de diversos genes/proteínas, tales como CYP2E1, CYP4A, UCP2, en la NASH y en la ASH, pero ninguno de estos genes tiene valor diagnóstico o predictivo del desarrollo de la enfermedad con el tiempo.

Actualmente, la mayoría de los pacientes con NASH son evaluados a causa de unos resultados de análisis de la función hepática elevados y crónicos (e.g., elevación moderada crónica de aminotransferasas), hepatomegalia o por ambos motivos. La combinación del historial clínico, examen físico, análisis de sangre, exámenes radiológicos e histológicos permite excluir otras causas de enfermedad hepática. El análisis de sangre debe incluir un perfil hepático completo, incluyendo, por ejemplo, el recuento de células sanguíneas y la determinación de anticuerpos anti-HCV, antígeno de superficie de la hepatitis B, índice de hierro, ceruloplasmina, anticuerpo antinuclear,  $\alpha_1$ -antitripsina y anticuerpo antimitocondrial. El diagnóstico por imagen, por ejemplo, mediante ultrasonografía hepática, la modalidad de diagnóstico por imagen preferida, revela la existencia de un hígado "brillante" de ecogenicidad aumentada. No obstante, la sensibilidad y especificidad de esta técnica de diagnóstico por imagen es de un 89%-95% y de un 84%-93%, respectivamente, para la esteatosis. La existencia de un hígado graso también puede ser diagnosticada mediante tomografía computerizada o mediante resonancia magnética

abdominal. A pesar de todo, los datos clínicos, analíticos y radiológicos no permiten diferenciar entre NASH y la hepatitis alcohólica ya que ambas patologías son histológicamente idénticas (presencia de esteatosis macrovesicular difusa o centrilobular, hepatocitos inflados, necrosis, infiltrado inflamatorio lobular mixto, con o sin fibrosis, 5 cuerpos de Mallory, lipogranulomas y núcleos glicogenazos). Por tanto, el diagnóstico de NASH sólo se confirma en casos de ausencia de consumo significativo de alcohol (típicamente menos de 20-40 g alcohol/día). Los marcadores moleculares que se han propuesto hasta la fecha (CYP2E1, CYP4A, UCP2) no tienen valor diagnóstico o predictivo del desarrollo de la enfermedad con el tiempo.

10 Existe, por tanto, la necesidad de disponer de herramientas que permitan estudiar la progresión de NASH a lo largo del tiempo e identificar marcadores moleculares asociados con NASH. Este tipo de herramientas podría ser un modelo animal que permitiera analizar el perfil de expresión de genes y proteínas en hígado normal y en hígado con NASH, así como durante la progresión de la enfermedad con el tiempo. La identificación de dichos 15 marcadores moleculares, en particular, marcadores moleculares tempranos, con valor diagnóstico y predictivo de NASH, y el estudio de sus efectos funcionales, ayudaría en la prevención y/o tratamiento de la NASH así como en la búsqueda y desarrollo de fármacos útiles para el tratamiento, preventivo y/o curativo, de NASH. Un buen marcador molecular de NASH sería aquél que apareciera tempranamente en el hígado, mucho antes de que se 20 observaran alteraciones histológicas. Idealmente, para diagnosticar con eficiencia el riesgo a padecer NASH se debería disponer, más que de un único marcador molecular, de un conjunto de marcadores moleculares tempranos de la aparición de NASH, que constituyeran algo así como la "huella molecular" temprana de la enfermedad.

En esa línea de experimentación, se ha desarrollado un modelo para el estudio *in vivo* de NASH. Se trata de un ratón knockout deficiente en el gen *MAT1A*, es decir, en la 25 síntesis de S-adenosilmetionina (AdoMet) en hígado, un metabolito esencial en las células, al que se le ha denominado MATO (Lu S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565). Estos ratones MATO desarrollan espontáneamente, además de NASH, estrés oxidativo y carcinoma hepatocelular (Martínez-Chantar M.L., *et al.*, Faseb J., 2002, 30 16:1292-1294). El gen *MAT1A* se expresa específicamente en el hígado adulto, aunque se ha demostrado que la expresión de ese gen se encuentra silenciada en pacientes con cirrosis hepática (tanto de origen alcohólico como no alcohólico). A los 3 meses de edad, el hígado

de los ratones MATO es normal pero es mucho más susceptible de desarrollar esteatosis macrovesicular severa (inducida por una dieta deficiente en colina) y necrosis (inducida por CCl<sub>4</sub>); a los 8 meses de edad desarrollan espontáneamente NASH; y a los 14-18 meses de edad tienen un elevado riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (más del 80% de los animales desarrollan tumores hepáticos). Experimentos preliminares de DNA microarray (Lu S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565) indican que a los 3 meses de edad (cuando la histología del hígado es aún normal) ya existen cientos de diferencias en la expresión de genes y proteínas entre los ratones normales o tipo salvaje (WT) y los ratones MATO. Es decir, mucho antes de observarse una lesión histológica en el hígado, la enfermedad hepática ya se ha iniciado a nivel molecular, aunque muchas de dichas diferencias no se mantienen durante la progresión de la enfermedad.

### COMPENDIO DE LA INVENCION

Un objetivo de esta invención consiste en el desarrollo de un método para el diagnóstico de NASH basado en el análisis de los perfiles de expresión en hígado de unas proteínas concretas que actúan como marcadores moleculares de dicha enfermedad.

Para identificar los marcadores moleculares de NASH y obtener la huella molecular de dicha enfermedad, los inventores han analizado la expresión diferencial de proteínas mediante técnicas de proteómica (electroforesis bidimensional e identificación de las proteínas diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas) en muestras de hígado de ratones WT y MATO [ratones mutantes knockout deficientes en el gen *MAT1A* (*MAT1A*<sup>-/-</sup>) (Lu S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565)] a lo largo del tiempo (1 y 15 días, 3 y 8 meses de edad) hasta la aparición de NASH. Dichos ratones mutantes MATO se eligieron porque podían utilizarse para estudiar la aparición de marcadores moleculares de NASH antes de que la enfermedad se hiciera evidente a nivel histológico.

Todos los ratones fueron tratados con una dieta normal. La aparición y evolución de NASH se siguió mediante control histológico. El análisis de esta información ha permitido identificar unas proteínas cuya expresión se encuentra alterada, bien aumentada o bien disminuida, desde el primer día después del nacimiento de un sujeto susceptible de desarrollar NASH hasta la aparición de NASH. Estas proteínas, útiles como marcadores moleculares de NASH, son las siguientes: apolipoproteína A1, subunidad  $\beta$  de la ATPasa

mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina, proteína antioxidante 2 (isoforma 1), prohibitina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de unión al selenio y proteína antioxidante 2 (isoforma 2). Las proteínas apolipoproteína A1, subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina y proteína antioxidante 2 (isoforma 1), aumentan su expresión en el hígado, mientras que las proteínas prohibitina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de unión al selenio y proteína antioxidante 2 (isoforma 2) disminuyen su expresión en el hígado, meses antes de la aparición de NASH en el hígado de ratones MATO. Estas proteínas pueden utilizarse como marcadores moleculares del riesgo a desarrollar la NASH, bien de forma aislada o combinada, considerando el perfil de expresión de la totalidad o de una parte de dichas proteínas, para determinar la huella molecular de NASH.

La apolipoproteína A1 (APA1) es el componente proteico de una lipoproteína que transporta lípidos en la sangre. Se han descrito variaciones en los niveles de APA1 asociados a la fibrosis hepática [Teare J.P., *et al.*, Lancet (North American Edition), 1993, 342:895-898].

La subunidad  $\beta$  de la ATPasa (ATPB) mitocondrial es un componente de la ATPasa (o ATP sintasa) mitocondrial, enzima que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico en mitocondrias utilizando la energía derivada de un gradiente de protones.

La leucotrieno A4 hidrolasa o LKHA es una enzima implicada en la biosíntesis de leucotrienos y es un marcador de la inflamación en general [Eberhard J., 2002, Virchows Archiv, 440(6):627-634].

Se ha descrito que tanto en la NASH como en la ASH existe una alteración en la relación keratina 18/keratina 8 [Denk H., *et al.*, Der Pathologe, 2001, 22(6):388-398]. Además, los niveles de keratina 18 (K1CR) son indicadores de otras enfermedades hepáticas, tales como el carcinoma hepático, la hepatitis crónica, la hepatitis alcohólica y la cirrosis criptogénica Caulin C., Journal of Cell Biology, 2000, 149(1):17-22; Toivola D.M., *et al.*, Experimental Cell Research, 2000, 255(2):156-170; Stumptner C., *et al.*, Hepatology, 1997, 26(4, parte 2):194A; Ku Nam-On, *et al.*, Journal of Clinical Investigation, 1997, 99(1):19-23].

La guanidina acetato N-metiltransferasa (GAMT) es una proteína implicada en el último paso de la biosíntesis de creatinina. La superóxido dismutasa (SODC) es una proteína que destruye radicales tóxicos para las células. La albúmina (ALBU) es una proteína de bajo peso molecular soluble en soluciones salinas diluidas y en agua con  
5 capacidad para unir agua, iones (sodio, potasio o calcio), ácidos grasos, hormonas, etc. La proteína antioxidante 2 (AOP2) protege frente al daño oxidativo. La metionina adenosil transferasa (MAT) cataliza la formación de AdoMet a partir de metionina y ATP. La acil CoA deshidrogenasa de cadena larga (ACDL) es una enzima implicada en el sistema de la beta-oxidación de los ácidos grasos mitocondrial. La proteína de unión al selenio (SBP) une  
10 selenio y acetaminofeno.

La prohibitina 1 (PHB1) es una proteína asociada a la membrana interna de la mitocondria, cuya función se ha relacionado con el plegamiento y estabilización de proteínas implicadas en la respiración mitocondrial. La deficiencia en PHB1 se ha asociado con una alteración de la función de la mitocondria y a un envejecimiento prematuro. Se ha  
15 descrito su relación con el cáncer de hígado [Seow T.K., *et al.*, Electrophoresis, 2000, 21(9):1787-1813].

No se ha establecido previamente ninguna relación entre la expresión de dichas proteínas y el desarrollo de NASH, por lo que ha resultado sorprendente su empleo como marcadores moleculares de dicha enfermedad y como huella molecular de la misma.

20 Por tanto, un aspecto de esta invención lo constituye un método para la recogida de datos que permita el diagnóstico precoz de NASH o su confirmación, que comprende detectar y cuantificar *in vitro*, en una muestra de tejido hepático procedente de un sujeto, los niveles (concentración) de una proteína seleccionada entre apolipoproteína A1, subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, guanidina acetato N-  
25 metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina, proteína antioxidante 2 (isoforma 1), prohibitina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de unión al selenio, proteína antioxidante 2 (isoforma 2), y combinaciones de las mismas, y comparar los resultados obtenidos con los valores normales, de referencia, de dichas proteínas en tejido hepático obtenidos a partir de hígados sanos. En una realización  
30 particular, dicha proteína se selecciona entre apolipoproteína A1, subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, prohibitina 1 y combinaciones de las mismas.

El método proporcionado por esta invención permite evaluar, de forma sencilla y fiable, el riesgo potencial de un sujeto a desarrollar NASH. Dicho sujeto puede ser un sujeto al que no se le ha diagnosticado previamente NASH, o bien un sujeto al que se le ha diagnosticado NASH pero que se desea confirmar dicho diagnóstico. Por tanto, en una  
5 realización particular dicho método permite evaluar la predisposición (diagnóstico precoz o pronóstico) de un sujeto a desarrollar NASH, mientras que en otra realización particular, dicho método permite confirmar (diagnosticar) la existencia de NASH en un sujeto.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una proteína seleccionada entre apolipoproteína A1, subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno  
10 A4 hidrolasa, keratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina, proteína antioxidante 2 (isoforma 1), prohibitina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de unión al selenio, proteína antioxidante 2 (isoforma 2), y sus combinaciones, en un método *in vitro* para diagnosticar NASH, o para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar NASH.

15

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 recoge la relación de las proteínas expresadas de forma diferencial en el hígado de ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup> durante la progresión de NASH. Extractos hepáticos de ratones WT y *MAT1A*<sup>-/-</sup> de 1, 15, 90 y 240 días de edad fueron analizados mediante  
20 electroforesis bidimensional. Las proteínas expresadas diferencialmente fueron identificadas mediante espectrometría de masas MALDI TOFF y se agruparon en base a los procesos biológicos en los que están implicadas según los criterios de Ontología de Genes: (1) Comunicación celular; (2) Crecimiento celular y/o mantenimiento; (3) Procesos de desarrollo.

25 La Figura 2 es un panel que ilustra las alteraciones metabólicas en el hígado de ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup> durante la progresión de NASH. Las enzimas metabólicas cuya expresión aumentaba o disminuía en el hígado de ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup> de 1, 15, 90 y 240 días de edad fueron mapeadas en el panel "Biochemical Pathways" de Boehringer Mannheim (<http://www.expasy.org>) utilizando el programa GARBAN desarrollado en la  
30 Universidad de Navarra.

La Figura 3A muestra los resultados de un análisis Western blot, en concreto, muestra los niveles hepáticos de PHB1, COX I, COX II, ATPB, en estado estacionario, en



el hígado de ratones WT y *MAT1A*<sup>-/-</sup>. Extractos de hígado (15 µg/calle) de ratones de 1 a 240 días de edad fueron analizados mediante Western blot. Para asegurarse de que la carga era la misma se efectuó una tinción de las membranas con Rojo-Ponceau. La Figura 3B muestra los resultados de un análisis Northern blot, en concreto de la expresión de PHB1, 5 COX II, ATPB, y rRNA 16S en hígados de ratones WT y *MAT1A*<sup>-/-</sup>. Las muestras de RNA de hígado (30 µg/calle) de ratones de 90 días de edad fueron analizadas mediante un análisis de hibridación Northern blot utilizando sondas específicas. Las membranas se hibridaron con una sonda para rRNA 18S con el fin de comprobar que las cargas eran iguales. La Figura 3C muestra los resultados de un análisis de Southern, en concreto de 10 DNA mitocondrial en ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> respecto a ratones WT. DNA total fue aislado de ratones de 3 meses de edad, escindido con *EcoRI* y utilizado en un análisis Southern con una sonda específica para COX II. Cantidades equivalentes de DNA en cada calle fueron aseguradas mediante tinción del gel con bromuro de etidio. Se muestran manchas representativas de 3 experimentos independientes.

15 La Figura 4 es un diagrama de barras que muestra el potencial de la membrana interna de la mitocondria. La funcionalidad de la membrana fue estudiada mediante la medida de dicho gradiente en un fracción mitocondrial enriquecida de hígados de ratones WT y *MAT1A*<sup>-/-</sup> de 3 meses. El valor del 100% fue 175,51±6,69 unidades de fluorescencia/mg proteína. Se representa la media de tres experimentos.

20 La Figura 5 ilustra la regulación de los niveles de PHB1 por AdoMet en hepatocitos de rata en cultivo. Los niveles de PHB1 fueron medidos en hepatocitos de rata en cultivo durante 12 ó 24 horas en presencia o ausencia de metionina 100 µM, AdoMet 4 mM o cicloleucina 20 mM. Extractos de hígado (15 µg/calle) fueron analizados mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Para asegurarse de que la carga era la misma se 25 efectuó una tinción de las membranas con Rojo-Ponceau. Cada mancha mostrada es representativa de 3 experimentos independientes.

La Figura 6A muestra los niveles hepáticos de PHB1, COX I y COX II, en estado estacionario, en el hígado de ratones WT y *ob/ob*. Cada mancha mostrada es representativa de 3 experimentos independientes. La Figura 6B muestra los niveles hepáticos de PHB1 y 30 COX I, en estado estacionario, en el hígado de pacientes control y obesos. Extractos de hígado (15 µg/calle) fueron analizados mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Para asegurarse de que la carga era la misma se efectuó una tinción de las

membranas con Rojo-Ponceau.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar  
5 NASH, o para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar NASH. Un método como  
el proporcionado por esta invención permite evaluar la predisposición o riesgo de un sujeto  
a desarrollar NASH, es decir, permite determinar aquéllos sujetos que, dentro de un grupo o  
población de sujetos, presentan un mayor riesgo a desarrollar NASH. A modo ilustrativo, se  
puede analizar un sujeto al que previamente no se le ha diagnosticado NASH, o que carece  
10 de síntomas, con el fin de obtener información sobre la posibilidad de que dicho sujeto  
desarrolle NASH en un futuro.

Asimismo, dicho método puede utilizarse tanto con fines de diagnóstico (método de  
diagnóstico) como con fines de pronóstico (método de pronóstico). Un método de  
diagnóstico se refiere a un ensayo realizado sobre un sujeto que presenta síntomas que  
15 podrían ser de NASH. Un método de pronóstico se refiere a un método que ayuda a  
predecir, al menos en parte, el curso de la enfermedad. En este sentido, se puede analizar un  
sujeto al que se le ha diagnosticado previamente NASH para conocer el progreso de la  
enfermedad, así como la posibilidad de que responda favorablemente a un tratamiento  
terapéutico concreto.

20 El término "sujeto" tal como se utiliza en la presente invención incluye seres  
humanos y animales, por ejemplo, mamíferos. En una realización particular dichos sujetos  
son seres humanos, hembras o machos, de cualquier edad o raza.

El término "esteatohepatitis no alcohólica" o "NASH" se utiliza en el sentido  
actualmente admitido por la comunidad científica.

25 De forma más concreta, la invención proporciona un método que comprende:

- a) recoger una muestra de tejido hepático de un sujeto;
- b) detectar y cuantificar en dicha muestra de tejido hepático el nivel de una  
proteína seleccionada entre apolipoproteína A1 (APA1), subunidad  $\beta$  de la  
ATPasa mitocondrial (ATPB), leucotrieno A4 hidrolasa (LKHA), keratina 18  
30 (K1CR), guanidina acetato N-metiltransferasa (GAMT), superóxido dismutasa  
(SODC), albúmina (ALBU), proteína antioxidante 2 (AOP2) (isoformas 1 y 2),  
prohibitina 1 (PHB1), metionina adenosil transferasa (MAT), acil CoA

deshidrogenasa de cadena larga (ACDL), proteína de unión al selenio (SBP), y combinaciones de las mismas; y

- c) comparar los resultados obtenidos en la etapa b) con los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático.

5 La muestra de tejido hepático a analizar puede ser una muestra de tejido hepático de cualquier parte del hígado del sujeto cuya predisposición a desarrollar NASH, o diagnosticar NASH, se desea conocer. Dicha muestra de tejido hepático procedente de dicho sujeto puede ser obtenida por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante biopsia.

10 La detección y cuantificación en una muestra de tejido hepático de los niveles (concentración) de dichas proteínas APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y/o SBP puede realizarse mediante el empleo de anticuerpos específicos frente a dichas proteínas, mediante técnicas de ELISA o Western blot. Alternativamente, dichas proteínas pueden detectarse y  
15 cuantificarse mediante el empleo de dispositivos de tipo biochip o microarray de proteínas que incluyan anticuerpos específicos frente a las proteínas a detectar, por ejemplo, microarrays de detección, que permiten la detección de proteínas diana y su cuantificación (Huang, RP. Detection of multiple proteins in an antibody-based protein microarray system. Journal of Immunological Methods 225 (2001): 1-13). El término "anticuerpo" tal como  
20 aquí se utiliza incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios de unión a ligando.

Aunque, en principio, bastaría con detectar y cuantificar el nivel de una de dichas proteínas, en la práctica, es preferible, detectar y cuantificar el nivel de dos o más de dichas  
25 proteínas, con el fin de obtener la huella molecular del sujeto en lo relativo a su predisposición a desarrollar NASH o a confirmar un diagnóstico de NASH.

Los resultados obtenidos en la etapa b), relativos a la detección y cuantificación de las proteínas APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y/o SBP, en la muestra de tejido hepático, se  
30 comparan con los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático procedente de hígados sanos. Dichos valores normales, de referencia, de dichas proteínas en tejido hepático pueden obtenerse mediante el análisis y cuantificación de dichas proteínas

en muestras de tejido hepático procedentes de hígados normales, es decir, de hígados procedentes de sujetos que no han desarrollado NASH ni ninguna otra enfermedad hepática que pudiera dar lugar a unos valores de referencia inadecuados para dichas proteínas. En general, los incrementos o disminuciones en los niveles de las proteínas marcadoras se  
5 estiman mediante la comparación de los resultados obtenidos de los análisis de las muestras correspondientes a los sujetos del ensayo con los resultados de las muestras controles, que se analizan en paralelo. En cada ensayo, cada sujeto se comparará con muestras controles validadas previamente.

Cuando la comparación de los resultados obtenidos en la etapa b) con los valores  
10 normales, de referencia, indica que:

(i) el nivel (concentración) de, al menos, una de las proteínas APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU o AOP2 (isoforma 1), es superior al límite superior de los valores normales, de referencia, para dichas  
15 proteínas en tejido hepático; y/o

(ii) el nivel (concentración) de, al menos, una de las proteínas PHB1, AOP2 (isoforma 2), MAT, ACDL o SBP es inferior al límite inferior de los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático,

20

entonces, dichos resultados son indicativos de la existencia de NASH en el sujeto cuya muestra de tejido hepático ha sido ensayada o bien de la existencia de una predisposición o riesgo elevado de dicho sujeto a desarrollar NASH en un futuro.

Un método como el descrito previamente permite obtener datos que permiten el  
25 diagnóstico precoz de NASH o su confirmación.

En una realización particular y preferida del método proporcionado por esta invención, la proteína marcadora de NASH se selecciona entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, PHB1 y combinaciones de las mismas. En este caso, un nivel (concentración) de, al menos, una de las proteínas APA1, ATPB, LKHA o K1CR, superior al límite superior de  
30 los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático, y/o un nivel (concentración) de PHB1 inferior al límite inferior de los valores normales, de referencia, para dicha proteína en tejido hepático, es indicativo de la existencia de NASH en el sujeto

cuya muestra de tejido hepático ha sido ensayada o bien de la existencia de una predisposición o riesgo elevado de dicho sujeto a desarrollar NASH en un futuro. Aunque, en principio, bastaría con detectar y cuantificar el nivel de una de dichas proteínas, en la práctica es recomendable detectar y cuantificar el nivel de, al menos, dos de ellas, 5 preferentemente, tres, más preferentemente, cuatro y, aún más preferentemente, los niveles de las cinco proteínas mencionadas ya que ello permitiría obtener la huella molecular del sujeto en lo relativo a su predisposición a desarrollar NASH o a confirmar un diagnóstico de NASH.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una proteína 10 seleccionada entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL, SBP y/o sus combinaciones, preferentemente, entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, PHB1, y/o sus combinaciones, en un método *in vitro* para diagnosticar NASH, o para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar NASH.

El siguiente Ejemplo sirve para ilustrar la invención y no debe ser considerado en 15 sentido limitativo de la misma.

## EJEMPLO 1

### **Análisis proteómico funcional de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH)**

Se han investigado los mecanismos moleculares implicados en la progresión de 20 NASH en el hígado de ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> mediante una aproximación proteómica de alto rendimiento.

### **1. Materiales y métodos**

25

#### **1.1 Materiales**

Los anticuerpos anti-citocromo c oxidasa subunidades I y II eran de Molecular Probes. El anticuerpo anti-prohibitina 1 era de Calbiochem. El anticuerpo anti-subunidad  $\beta$  de la ATP sintasa de mitocondria era de Molecular Probes. Los reactivos de electroforesis eran de Bio-Rad. La tripsina, de Promega; la urea y la collagenasa, de Gibco BRL; y la 30 tiourea, de Merck. El resto de los reactivos químicos era de Sigma.

Los animales [ratones tipo salvaje (WT) y mutantes knockout deficientes en el gen *MAT1A* (*MAT1A*<sup>-/-</sup>) o ratones MATO (Lu S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001;

98:5560-5565)] procedían de la colonia endogámica de los propios solicitantes y fueron tratados de forma humanitaria de acuerdo con las guías institucionales de los solicitantes. Los ratones *ob/ob* se adquirieron a Jackson Laboratories (Bar Harbor, MI). Las muestras humanas fueron obtenidas en el Hospital Príncipe de Asturias, cuyo comité para la  
5 supervisión de investigación humana aprobó este estudio.

## 1.2 Métodos

### Análisis proteómico de alto rendimiento

Las muestras de hígado fueron homogeneizadas en 20 volúmenes de tampón de lisis  
10 que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 1% y 3-10 anfolitos Bio-Lyte 0,5% . Los homogeneizados fueron centrifugados a 100,000 x g durante 45 minutos a 15°C. La concentración de proteína fue determinada en los sobrenadantes mediante el empleo del kit de ensayo Bradford (Bio-Rad) utilizando albúmina diluida en tampón de ruptura como patrón. La primera separación, por isoelectroenfoque, se realizó en una célula Protean IEF  
15 (Bio-Rad) utilizando tiras de 17 cm ReadyStrips IPG con diferentes intervalos de pH. Las muestras (300-700 µg de proteína) se cargaron y se realizó una rehidratación activa durante 12 h a 50 V y 20°C. Los geles se corrieron a 60.000 Vh utilizando un protocolo de aumento progresivo desarrollado por el fabricante. Las tiras IPG fueron equilibradas en Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2% y DTT 2% e incubadas en el mismo tampón  
20 conteniendo 2,5% de yodoacetamida y azul bromofenol, en ausencia de DTT. La tiras IPG fueron cargadas directamente en geles de poliacrilamida al 12,5% (18 cm x 20 cm x 1 mm) y sellados con agarosa de bajo punto de fusión. Los geles de la segunda separación, por SDS-PAGE, se corrieron durante 15 h. Los geles fueron teñidos con Phastgel Blue R preparado en agua (65%), etanol (25%) y ácido acético (10%). Alternativamente, se tiñeron  
25 con plata utilizando el kit de tinción con plata de Amersham. Las imágenes fueron digitalizadas con un "Imaging Densitometer" de Bio-Rad y analizadas utilizando el programa PDQuest. Se detectaron diferencias cualitativas y cuantitativas pero únicamente fueron aceptadas cuando eran confirmadas, al menos, dos veces, en 5 experimentos independientes. Las manchas de los geles correspondientes a proteínas expresadas de forma  
30 diferencial se recogieron de forma manual y se procesaron en una estación MassPrep de Micromass. Los especímenes del gel se destifieron con bicarbonato amónico 50mM y acetonitrilo 50% (geles teñidos con Coomassie) o con ferricianuro potásico 15 mM y

tiosulfato sódico 50 mM (geles teñidos con plata). A continuación, las proteínas se redujeron con DTT 10 mM en bicarbonato amónico 100 mM y fueron alquiladas con yodoacetamida 55 mM en el mismo tampón. Posteriormente se realizó una digestión de las proteínas en el mismo gel con tripsina 6 ng/ $\mu$ l en bicarbonato amónico 50 mM, durante 5 h a 37°C. Los péptidos resultantes se extrajeron con ácido fórmico 1% y acetonitrilo 2%. Finalmente, 2  $\mu$ l de muestra se mezclaron con 2  $\mu$ l de una disolución saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-transcinámico en TFA al 0,1%, acetonitrilo al 50% y, a continuación, fueron depositados en una placa diana MALDI. Los fragmentos de la digestión con tripsina fueron analizados en un espectrómetro de masas MALDI TOFF GL-REF de Micromass. El procesamiento de los datos se llevó a cabo con MassLynx y las bases de datos de búsqueda (SWISSPROT, TREMBL, ENSEMBL) para identificar las proteínas de interés a partir de su huella dactilar peptídica se realizó con ProteinLynx Global Server (Micromass). El análisis de datos y su agrupamiento se realizó con GARBAN (no publicado).

#### 15 Aislamiento y cultivo de hepatocitos de rata

Los hepatocitos fueron aislados de ratas Wistar masculinas (200-250 g) mediante perfusión con colagenasas, tal como se ha descrito previamente (Avila, M.A., *et al.*, Gastroenterology, 1998, 114:364-371). Una vez aislados, los hepatocitos se cultivaron de acuerdo con García-Trevijano y col. (García-Trevijano, E.R., *et al.*, Faseb J, 2000, 14:2511-2518) en presencia o ausencia de metionina 100  $\mu$ M, AdoMet 4 mM o cicloleucina (CL) 20 mM durante los períodos indicados de tiempo. La viabilidad celular fue medida mediante exclusión de azul de tripano, no observándose diferencias significativas en ningún momento entre los controles y ninguno de los diversos tratamientos llevados a cabo en este estudio.

25

#### Aislamiento mitocondrial y caracterización

Se obtuvo una fracción mitocondrial enriquecida a partir de 100 mg de especímenes de hígado con el kit de aislamiento de mitocondrias (Mitochondria Isolation Kit) de Sigma. El gradiente electroquímico de protón ( $\Delta\psi$ ) de la membrana interna mitocondrial fue analizado midiendo la captación del colorante fluorescente carbocianina JC-1 en el interior de la mitocondria, siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Las mediciones de fluorescencia se hicieron utilizando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 B.

### Aislamiento de RNA y análisis de hibridación Northern

El RNA de hígado total fue aislado mediante el empleo del método del tiocianato de guanidinio (García-Trevijano, E.R., *et al.*, Faseb J, 2000, 14:2511-2518). La concentración de RNA fue determinada espectrofotométricamente antes de su uso, y su integridad se comprobó mediante electroforesis con posterior tinción con bromuro de etidio. La electroforesis y la transferencia al gel se realizaron siguiendo un protocolo descrito previamente (Lu, S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565). El cDNA de la prohibitina 1 fue clonado mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa a partir de hígado de ratón. Se utilizaron el sistema de preamplificación Superscript (Life Technologies), la enzima Taq Long plus (Stratagene) y los iniciadores sentido 5'-atggctgccaagtggttgagtc-3' y antisentido 5'-tcactggggaagctggagaagc-3'. Se han descrito sondas para la subunidad  $\beta$  de la ATPasa y para las subunidades I y II de la citocromo oxidasa (Izquierdo & Cuezva, Mol. Cell. Biob, 1997, 17:5255-5268; Otero, G., *et al.*, Carcinogenesis, 1997, 18:1569-1575). Los análisis de hibridación Northern fueron realizados sobre RNA total utilizando procedimientos convencionales (Lu S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565). Todas las sondas fueron marcadas con [ $^{32}$ P]dCTP utilizando el sistema Rediprime DNA Labeling System de Amersham. Para asegurar la carga igual de las muestras de RNA, las membranas también fueron hibridadas con una sonda marcada con  $^{32}$ P rRNA 8S. Se utilizaron autoradiografía y densitometría para cuantificar el RNA relativo. Los resultados del análisis Northern blot se normalizaron a 18S rRNA.

### Aislamiento de DNA y análisis Sourthern blot

El DNA total fue extraído a partir de hígados de ratones de 3 meses de edad WT y MAT1A $^{-/-}$ , tal como se ha descrito previamente (34). El DNA celular total (20  $\mu$ g) fue digerido con EcoRI. El DNA digerido fue resuelto sobre gel de agarosa al 1%, transferido y fijado a membranas de nylon. Las membranas fueron incubadas con una sonda de COX II marcada con [ $^{32}$ P]dCTP. Las condiciones para la hibridación y lavado de la membrana fueron las descritas anteriormente (Otero, G., *et al.*, Carcinogenesis, 1997, 18:1569-1575).

### Análisis Western Blot



La extracción de proteína y el análisis "western blotting" se realizaron tal como se ha descrito anteriormente (Avila, M.A., *et al.*, Oncogene, 1995, 10:963-971; Ruiz, F., *et al.*, Hepatology, 1998, 28:1051-1057). Brevemente, cantidades iguales de proteína (15 µg) fueron resueltas en geles SDS-poliacrilamida al 12,5%. Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron sondeadas con anti-MAT (Ruiz, F., *et al.*, Hepatology, 1998, 28:1051-1057), anti-PHB1, anti-ATPasa  $\beta$  y anti-COX I y II. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano. Los blots fueron revelados mediante quimioluminiscencia (Dupont).

10

## 2. Resultados

### Huella dactilar proteómica de la patogénesis de NASH en ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup>

Se han investigado los mecanismos moleculares implicados en la progresión de NASH en el hígado de ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> mediante una aproximación proteómica de alto rendimiento. Se han obtenido patrones de expresión de proteínas mediante análisis bidimensional de extractos de hígado de ratones WT y *MAT1A*<sup>-/-</sup> de 1, 15, 90 y 240 días de edad. Se realizaron cinco experimentos independientes utilizando extractos de hígado de distintos animales. En base a los resultados del análisis de imagen con PDQuest (BioRad), se visualizaron una media de 1.500 a 2.000 manchas dependiendo del procedimiento de tinción del gel. Las imágenes de los geles de los ratones WT y *MAT1A*<sup>-/-</sup> fueron comparadas para determinar las diferencias en la expresión de proteínas, aceptándose únicamente aquéllos cambios en los que se confirmaba un aumento del doble, o una reducción a la mitad, en los 5 experimentos.

El análisis reveló que tan solo 1 día después del nacimiento, ya se habían inducido 140 diferencias en el hígado de los ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> y que los cambios se acumulaban con la edad (242, 259 y 297 cambios a los 15, 90 y 240 días respectivamente). La distribución entre las proteínas que aumentan su expresión y las proteínas que disminuyen su expresión se mantiene hasta 3 meses, el 53%-70% de las proteínas aumentaron su expresión y el 30%-47% disminuyeron su expresión. En contraste, este perfil cambia en hígados de ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup> de 8 meses de edad, cuando el NASH ya está desarrollado, en donde el 27% eran proteínas que aumentaban su expresión y el 73% proteínas que disminuían su expresión. De todos los cambios iniciales, sólo las proteínas más abundantes representadas en las bases de datos fueron identificadas mediante huella dactilar de masa de péptidos,

dando como resultado 117 proteínas identificadas con éxito.

Se ha encontrado una correlación lineal entre  $M_r$  y  $pI$  calculados a partir de la secuencia de las proteínas identificadas y el  $R_f$  experimental de la mancha correspondiente, calculada a partir de los geles bidimensionales (datos no mostrados). Este descubrimiento valida aún más la identidad de las manchas analizadas. Se observaron algunas desviaciones del  $pI$  respecto a la linealidad, lo que es probablemente debido a modificaciones post-traducción.

El perfil de expresión proteica específico de hígados de ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> proporciona una huella proteómica de NASH. Las proteínas de expresión aumentada o disminuida fueron clasificadas según los procesos biológicos en los que están implicadas de acuerdo con los criterios de Ontología Genética (Gene Ontology) y fueron representadas tal como se muestra en la Figura 1. La mayoría de las proteínas expresadas de forma diferencial en el hígado de los ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup> se agrupaban en tres procesos biológicos: comunicación celular (grupo 1), crecimiento celular y/o mantenimiento (grupo 2) y procesos de desarrollo (grupo 3) (Figura 1). Algunas de las proteínas identificadas en estos grupos están implicadas en la embriogénesis, morfogénesis y envejecimiento, tales como la cadena 6 de la tubulina  $\alpha$ , la cadena 5 de la tubulina  $\alpha$ , la actina y la prohibitina 1 (PHB1), que controla la síntesis de DNA y regula la proliferación celular. Asimismo, proteínas implicadas en respuestas a estrés, tales como la hidrolasa leucotrieno A4 (LKHA), aumentaban su expresión. También se identificaron cambios en el perfil de expresión de proteínas implicadas en el estrés oxidativo, por ejemplo, glutatión peroxidasa, proteínas antioxidantes 1 y 2 (AOP2) o superóxido dismutasa  $Cu^{++}/Zn^{++}$  (SODC). Finalmente, de acuerdo con la amplia actividad metabólica del hígado, el 80% de las proteínas cuya expresión cambia en ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup>, corresponde a proteínas metabólicas. La mayoría de las alteraciones afectan al metabolismo de carbohidratos y aminoácidos. Por ejemplo, la fructosa 1,6-bisfosfatasa (aumentaba su expresión) y la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (disminuía su expresión), enzimas clave en la gluconeogenesis y glucolisis respectivamente. La acil CoA deshidrogenasa de cadena larga específica (ACDL) y la delta 3,5 delta 2,4 dienoil CoA isomerasa (ambas disminuían su expresión) están implicadas en la beta-oxidación de ácidos grasos. La apolipoproteína A1 (APA1) (aumentaba su expresión) y la farnesil pirofosfato sintetasa (disminuía su expresión) participan en el transporte y biosíntesis de colesterol, respectivamente; y la malato deshidrogenasa e

isocitrato deshidrogenasa (ambas disminuían su expresión) catalizan dos etapas del ciclo del citrato. Asimismo, se identificaron diferencias importantes que afectan al metabolismo de aminoácidos ramificados, aromáticos y con azufre (Figura 2).

Un grupo de 12 proteínas cambiaron su perfil de expresión tan solo 1 día después del nacimiento y mantuvieron esa alteración a lo largo de la progresión de NASH en hígado de ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> (Figura 1). Estas proteínas, que pueden ser consideradas como marcadores tempranos de NASH, fueron identificadas como APA1, LKHA, proteína de unión a selenio (SBP), AOP2, MAT, keratina 18 tipo 1 citoesquelética (K1CR), guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT), PHB1, SODC, albúmina, ACDL y la subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial (ATPB). La mayoría de estas proteínas son enzimas metabólicas o participan en la respuesta antioxidante de los hepatocitos de los ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup>. De forma interesante, la PHB1 y ATPB son proteínas mitocondriales, por lo que cambios en su expresión pueden comprometer la función mitocondrial.

#### 15     **AdoMet regula una red de proteínas mitocondriales y la función mitocondrial**

La alteración de la función mitocondrial puede ser un factor clave en la progresión de NASH en ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup>. El aumento en la expresión (450%) de la ATPB y la disminución en la expresión (53%) de PHB1 fueron confirmados mediante análisis "western blot" utilizando anticuerpos específicos (Figura 3A). Asimismo, los niveles de estado estacionario de las subunidades I y II de la citocromo c oxidasa (COX) fueron también reducidos en hígado de ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup> (55% y 53% respectivamente). Estas alteraciones no fueron observadas en otros tejidos (no mostrados). La expresión de genes codificantes de estas proteínas también fue investigada mediante análisis Northern blot. El nivel de mRNA de la ATPB aumenta el doble en hígado de ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> (Figura 3B). Por el contrario, los niveles de mRNA de PHB1 y COX II, así como de rRNA 16S, fueron similares a los encontrados en los animales WT (Figura 3B). Estas observaciones indican que la disminución de la expresión de las subunidades PHB1 y COX mediante AdoMet implica mecanismos post-traducción. Mientras que PHB1 es el producto de un gen nuclear, las subunidades COX están codificadas por genes mitocondriales. Adicionalmente, no se observaron cambios en el contenido de DNA mitocondrial en hígado de ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> (Figura 3C). Cambios en el perfil de expresión de las proteínas PHB1, COX y ATPB sugieren una deficiencia en la respiración mitocondrial.

El potencial de la membrana interna mitocondrial fue medido en una fracción mitocondrial enriquecida purificada a partir de extractos de hígado de ratones WT y *MAT1A*<sup>-/-</sup>. Se observó una reducción de un 40% en el gradiente electroquímico de protón en los extractos de hígado de los ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup> (Figura 4), indicando una  
5 deficiencia en la integridad de la membrana interna mitocondrial.

### Regulación de PHB1 por AdoMet

Se ha investigado si AdoMet regula los niveles de PHB1 en hepatocitos de rata cultivados. En presencia de metionina o AdoMet en medios de cultivo, no se detectó ningún  
10 efecto en los niveles de proteína PHB1 después de 24 h de incubación bajo condiciones estándar (Figura 5). Sin embargo, se apreció una disminución de la síntesis de AdoMet mediante restricción de metionina o adición al medio de cultivo de CL, un conocido inhibidor de la actividad MAT, dando como resultado una disminución en la expresión de PHB1 (53% y 55% respectivamente) (Figura 5). La restauración del conjunto intracelular  
15 del hepatocito de AdoMet mediante adición exógena de este compuesto después de 12 h de cultivo en ausencia de metionina evitó la caída de PHB1.

### Deficiencia en AdoMet y alteraciones mitocondriales en ratones *ob/ob* y en pacientes obesos

20 Para poder evaluar si las alteraciones observadas en ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> proporcionan nuevos mecanismos por los que NASH puede ser inducido, se investigaron los niveles de estado estacionario de PHB1 y COX en muestras de hígado de ratones *ob/ob* y pacientes obesos, dos condiciones propensas a desarrollar NASH. Análisis western blot revelaron que PHB1 y COX I, II reducen su expresión en hígado de ratones *ob/ob* (76% y 81% y 70%  
25 respectivamente). La disminución en la expresión de PHB1 (53%) y COX I (82%) también fue confirmada en el hígado de pacientes obesos aunque el nivel de COX II era similar al encontrado en hígado de control (Figura 6). De forma similar a la de los ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup>, los niveles de mRNA de PHB y COX I y II en ratones *ob/ob* y en paciente obesos se correlaciona con los niveles encontrados en animales de control (no mostrado).

30

### 3. Discusión

AdoMet ha sido generalmente considerado como un metabolito intermediario

central implicado en la síntesis de homocistefna y poliaminas así como es el principal donador del grupo metilo celular. Sin embargo, recientes evidencias indican que, además de esta función metabólica central, AdoMet es en el hígado un interruptor de control celular que regula funciones esenciales de hepatocitos tales como proliferación, diferenciación y muerte (Mato, J.M. *et al.*, Faseb J, 2002, 16:15-26). Para comprender mejor los mecanismos por los que estas funciones no tradicionales de AdoMet tienen lugar, se ha estudiado la patogénesis de NASH en ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup> deficientes en síntesis hepática de AdoMet utilizando un aproximación proteómica de alto rendimiento.

El análisis de los diferentes perfiles de expresión de proteínas en ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> y WT indica que una deficiencia crónica en la síntesis de AdoMet tiene un efecto pleiotrópico en el hígado que altera funciones hepáticas esenciales. Se han identificado 117 proteínas que se expresan de forma diferencial en el hígado de ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> durante la progresión de NASH. El análisis global de las diferencias observadas indica un aumento en la expresión de proteínas antioxidantes (SODC, catalasa, glutatión peroxidasa) en el hígado de ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> que puede reflejar un mecanismo de adaptación para disipar el estrés oxidativo generado por genes oxidantes. Alteraciones metabólicas importantes también se encontraron en el nivel de expresión de proteínas en el hígado de ratones mutantes *MAT1A*<sup>-/-</sup>. El metabolismo de lípidos, carbohidratos y aminoácidos está dañado en ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> desde el nacimiento, aunque las diferencias se acumulan durante la progresión de NASH. Estas proteínas que aumentan o disminuyen su expresión proporcionan un perfil proteómico específico que podría explicar algunas de las alteraciones metabólicas reminiscentes a las encontradas en obesidad y otras condiciones asociadas con NASH, que conducen al desarrollo de cirrosis y HCC (Ried, A.E., Gastroenterology, 2001, 121:710-723; Angulo, P., N. Engl. J. Med., 2002, 346:1221-1231; Clark, J.M., *et al.*, Gastroenterolgy, 2002, 122:1649-1657).

El análisis de las 117 proteínas que se expresan de manera diferencial en el hígado de ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> reveló que la mayoría de los cambios detectados 1 día después del nacimiento no se mantienen durante la progresión de NASH. Estas diferencias dependientes del tiempo pueden reflejar la adaptación del hepatocito a realizar su función biológica normal bajo una deficiencia crónica de AdoMet llevando a la acumulación de alteraciones que condicionan el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, 12 proteínas cambian su patrón de expresión después del nacimiento, cuando *MAT1A*<sup>-/-</sup> se activa en ratones WT, y

esta alteración se mantiene hasta la aparición de lesiones histológicas. Entre estos cambios tempranos están, el aumento de expresión de las proteínas SODC y AOP2, que ha sido deducido a partir de los geles bidimensionales de acuerdo con evidencias anteriores (Rabilloud, T., et al., J. Biol. Chem., 2002, 277:19396-19401), así como la disminución de la expresión de ACDL y el aumento de la expresión de APA1. Estas alteraciones están de acuerdo con la implicación de estrés oxidativo y metabolismo lipídico anormal en la patogénesis de la enfermedad de hígado graso. Es interesante que 4 proteínas implicadas en la función mitocondrial también han sido identificadas, la ATPB, COX I, COX II y PHB1. El aumento en la expresión de la ATPB ha sido implicado en la maduración mitocondrial y en la transformación neoplásica celular, que es consistente con el estado proliferativo y rediferenciado de hepatocitos *MAT1A*<sup>-/-</sup>. La disminución en la expresión de COX indica una transferencia deficiente de electrones al oxígeno, la última etapa de la cadena mitocondrial de transferencia de electrones y por ello proporciona una explicación molecular para el estrés oxidativo encontrado en hígados *MAT1A*<sup>-/-</sup>. La caída de los niveles de estado estacionario de PHB1 puede explicar la disminución en la expresión de COX. PHB1 es el producto de un gen nuclear que está asociado a la membrana interna mitocondrial. Se ha propuesto recientemente que PBH1 es una proteína tipo caperona que participa en el correcto plegamiento y acoplamiento de algunos de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. De acuerdo con esta hipótesis, una deficiencia en PHB1 puede perjudicar la organización nativa y funcional de proteínas respiratorias que son posteriormente degradadas por proteasas mitocondriales, comprometiendo la funcionalidad mitocondrial. Por ello, el descenso de PHB1 puede inducir una reducción de COX con la pérdida concomitante de la función mitocondrial en hepatocitos *MAT1A*<sup>-/-</sup>.

La correlación entre una deficiencia en la síntesis de AdoMet y la disminución en la expresión de PHB1 encontrada en ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> fue confirmada mediante experimentos *in vitro* sobre hepatocitos de rata aislados. La reducción de la síntesis de AdoMet utilizando un medio de cultivo sin metionina o en presencia de CL, un inhibidor de la actividad MAT, da como resultado una disminución en la expresión de PHB1. La recuperación del contenido de AdoMet en el hepatocito evitaba la caída de PHB1.

Los niveles del estado estacionario de PHB1 también disminuían en el hígado de ratones *ob/ob* y en pacientes obesos, los cuales están predispuestos a desarrollar NASH. NASH es un desorden crónico con una prevalencia en aumento en la población por lo que

se está convirtiendo en una de las prioridades de la hepatología clínica. Aunque la patogénesis de NASH se conoce poco, la presente evidencia apoya la existencia de alteraciones mitocondriales que se correlacionan con el estrés oxidativo como uno de los factores importantes. La disminución en la expresión de PHB1 y COX inducida por una

5 deficiencia crónica en AdoMet puede proporcionar un nuevo mecanismo molecular implicado en la patogénesis de NASH. Los resultados obtenidos con ratones *MAT1A*<sup>-/-</sup> indican que los niveles de PHB1 y COX caen bastante tiempo antes de que se manifestara ningún síntoma histológico de la enfermedad y, por tanto, pueden ser útiles en el diagnóstico precoz y en el tratamiento de NASH.

10 En resumen, los resultados obtenidos proporcionan un nuevo mecanismo mediante el cual una deficiencia en AdoMet afecta adversamente a la función mitocondrial y genera un estrés oxidativo en el hígado. La caída en los niveles de PHB1 bajo una deficiencia crónica en AdoMet que conduce a un fallo mitocondrial y a un metabolismo anormal de lípidos, hidratos de carbono y aminoácidos puede explicar, al menos en parte, la

15 patogénesis de NASH.

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para diagnosticar NASH, o para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar NASH, que comprende:

5

a) recoger una muestra de tejido hepático de un sujeto;

10

b) detectar y cuantificar en dicha muestra de tejido hepático el nivel de una proteína seleccionada entre apolipoproteína A1 (APA1), subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial (ATPB), leucotrieno A4 hidrolasa (LKHA), keratina 18 (K1CR), guanidina acetato N-metiltransferasa (GAMT), superóxido dismutasa (SODC), albúmina (ALBU), proteína antioxidante 2 (AOP2) (isoformas 1 y 2), inhibitina 1 (PHB1), metionina adenosil transferasa (MAT), acil CoA deshidrogenasa de cadena larga (ACDL), proteína de unión al selenio (SBP), y combinaciones de las mismas; y

15

c) comparar los resultados obtenidos en la etapa b) con los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático.

20

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un ser humano.

3. Método según la reivindicación 1, en el que la detección y cuantificación de dicha proteína seleccionada entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y/o SBP se realiza mediante el empleo de anticuerpos específicos frente a dichas proteínas.

25

4. Método según la reivindicación 3, en el que dichos anticuerpos comprenden anticuerpos monoclonales, policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos específicos frente a dichas proteínas.

30

5. Método según la reivindicación 1, en el que la detección y cuantificación de dicha proteína seleccionada entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2



(isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y/o SBP se realiza mediante técnicas de ELISA o Western blot, o mediante el empleo de dispositivos de tipo biochip o microarray de proteínas que incluyan anticuerpos específicos frente a las proteínas a detectar.

5

6. Método según la reivindicación 1, que comprende detectar y cuantificar el nivel de una proteína seleccionada entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y SBP.

10 7. Método según la reivindicación 1, que comprende detectar y cuantificar el nivel de dos o más proteínas seleccionadas entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y SBP.

8. Método según la reivindicación 1, en el que cuando la comparación de los  
15 resultados obtenidos en la etapa b) con los valores normales, de referencia, indica que:

(i) la concentración de, al menos, una de las proteínas APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU o AOP2 (isoforma 1), es superior al límite superior de los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en  
20 tejido hepático; y/o

(ii) la concentración de, al menos, una de las proteínas PHB1, AOP2 (isoforma 2), MAT, ACDL o SBP es inferior al límite inferior de los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático,

25

entonces, dichos resultados son indicativos de la existencia de NASH en el sujeto cuya muestra de tejido hepático ha sido ensayada o bien de la existencia de una predisposición de dicho sujeto a desarrollar NASH en un futuro.

30 9. Método según la reivindicación 1, en el que dicha proteína a detectar y cuantificar se selecciona entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, PHB1 y sus combinaciones.

10. Método según la reivindicación 9, que comprende detectar y cuantificar el nivel de una proteína seleccionada entre APA1, ATPB, LKHA, keratina 18 y PHB1.

11. Método según la reivindicación 9, que comprende detectar y cuantificar los  
5 niveles de, al menos, dos proteínas seleccionadas entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR y PHB1.

12. Método según la reivindicación 9, que comprende detectar y cuantificar los  
niveles de tres o cuatro proteínas seleccionadas entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR y  
10 PHB1.

13. Método según la reivindicación 9, que comprende detectar y cuantificar los niveles de las proteínas APA1, ATPB, LKHA, K1CR y PHB1.

15 14. Empleo de una proteína seleccionada entre apolipoproteína A1 (APA1), subunidad  $\beta$  de la ATPasa mitocondrial (ATPB), leucotrieno A4 hidrolasa (LKHA), keratina 18 (K1CR), guanidina acetato N-metiltransferasa (GAMT), superóxido dismutasa (SODC), albúmina (ALBU), proteína antioxidante 2 (AOP2) (isoformas 1 y 2), prohibitina 1 (PHB1), metionina adenosil transferasa (MAT), acil CoA deshidrogenasa de cadena larga  
20 (ACDL), proteína de unión al selenio (SBP), y combinaciones de las mismas, en un método *in vitro* para diagnosticar NASH, o para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar NASH.

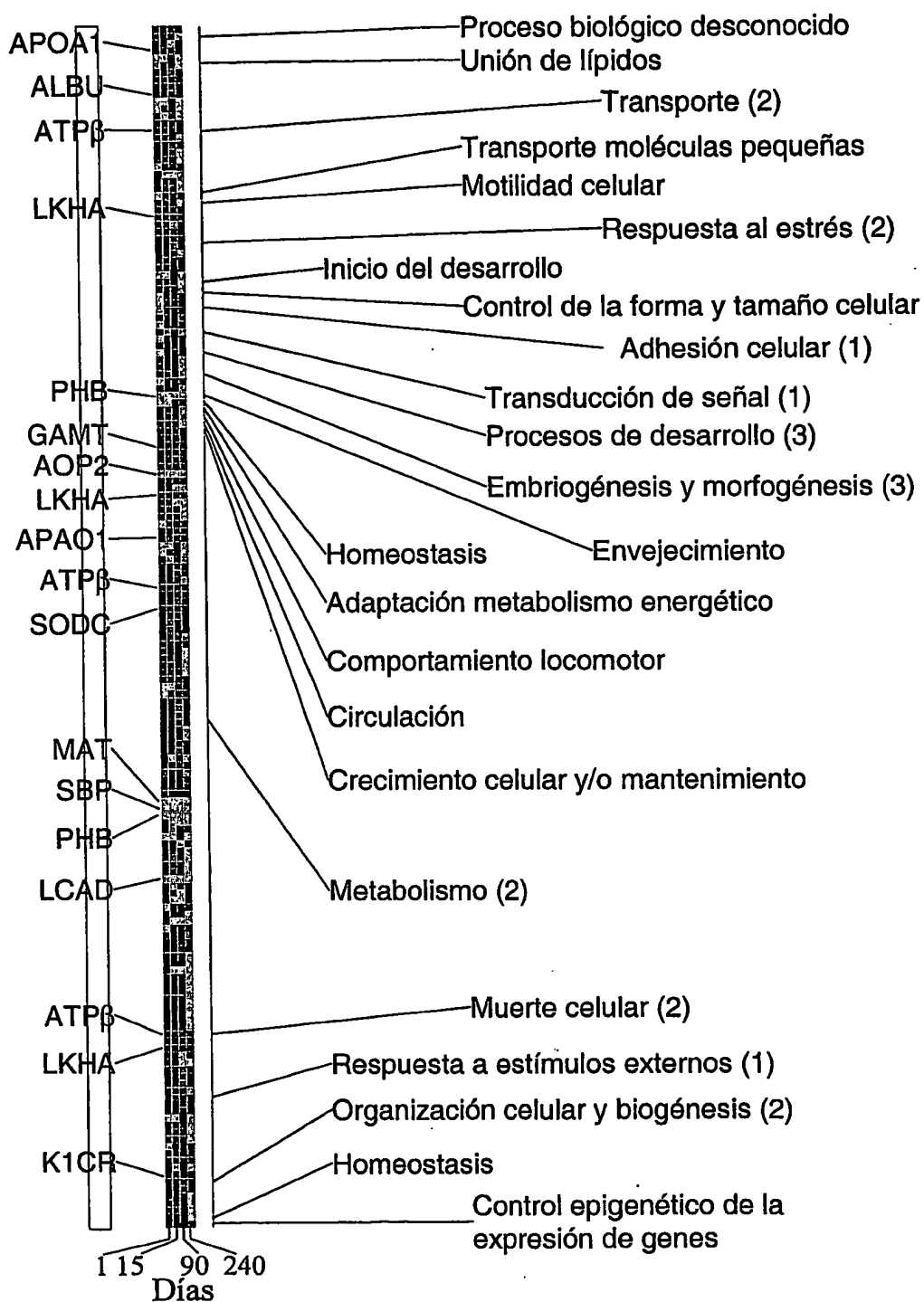


FIGURA 1

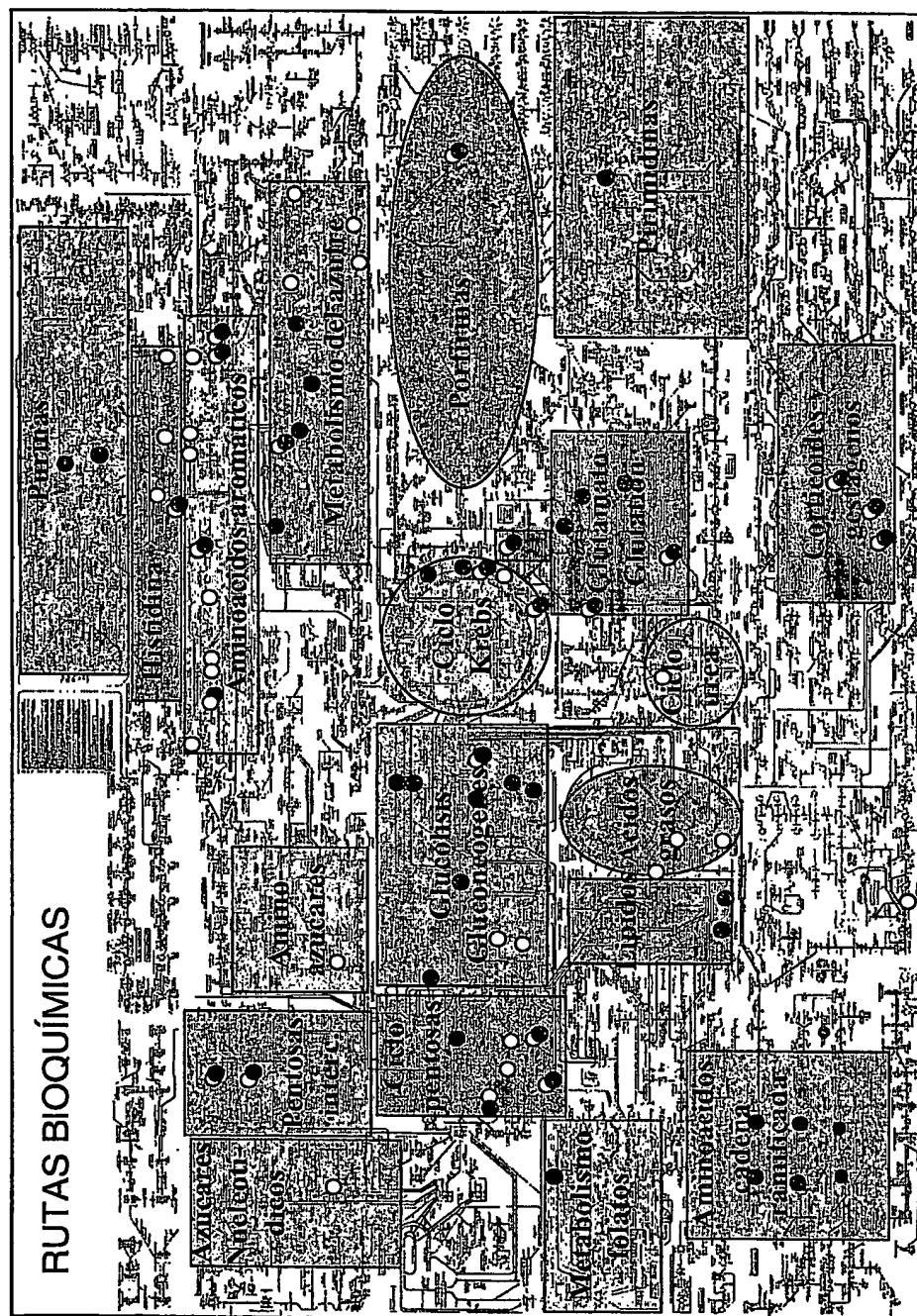


FIGURA 2

3/5

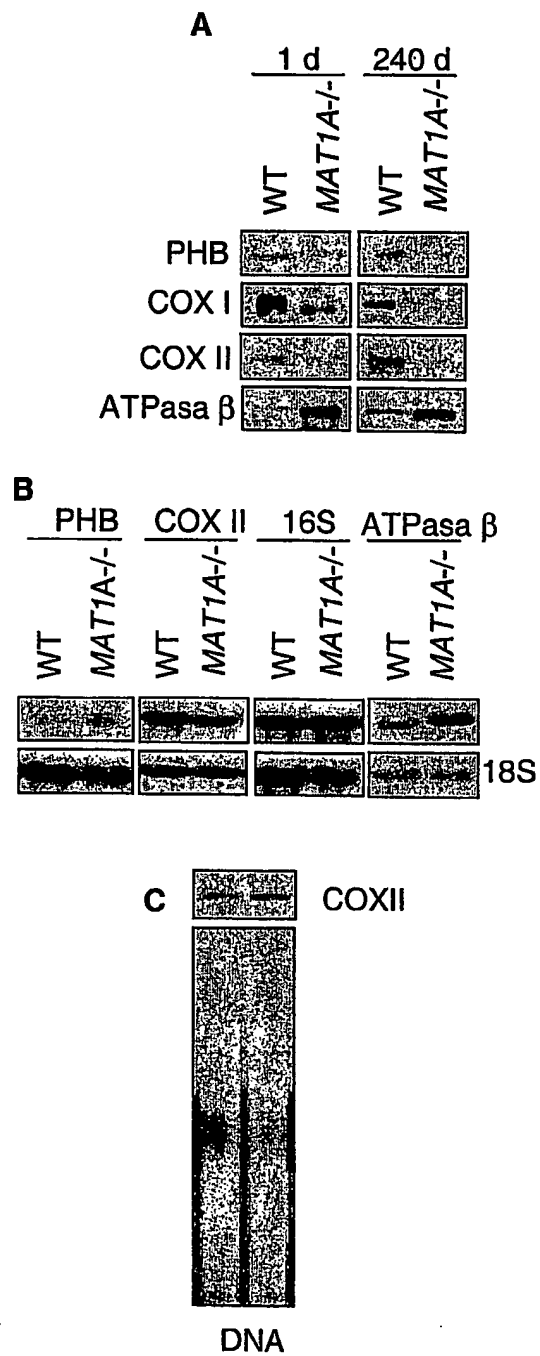


FIGURA 3

4/5

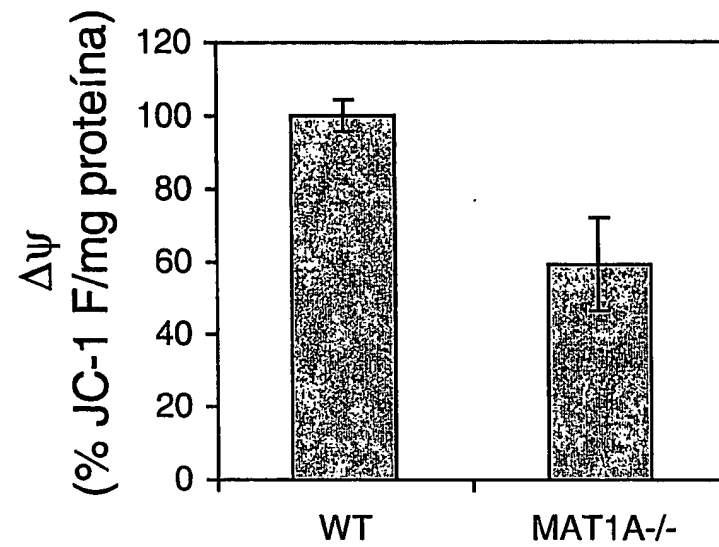


FIGURA 4

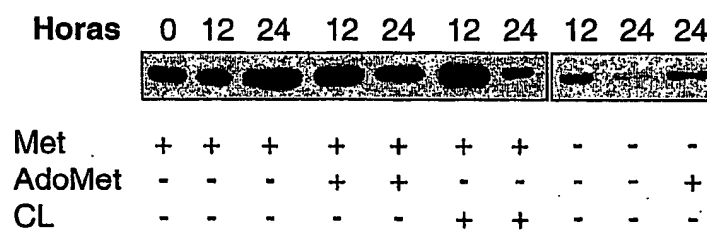


FIGURA 5

5/5

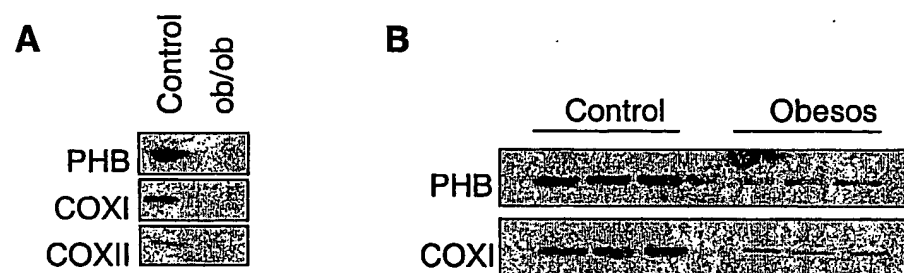


FIGURA 6

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>7</sup> G01N 33/68, 33/576

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>7</sup> G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, HCAPLUS, GOOGLE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHELLY, C.L. et al. "Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation". PNAS, Vol. 98, n°10, 8 may 2001, <b>pages 5560-5565, discussion</b>	1-8, 14
X	MATO, J.M. et al. "S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. FASEB J. Vol. 16, 2002, <b>pages 15-26, figure 3.</b>	1-8, 14
X	ZATLOUKAL, K. et al. "Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis". REV. ESP. PATOL. Vol. 32, n° 3, 1999, <b>pages 293-294, the whole document</b>	1-14
PX	SANTAMARIA, E. et al. "Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: Mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine". PNAS, Vol. 100, n° 6, 18 March 2003, <b>pages 3065-3070, the whole document</b>	1-14

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

(29.03.2004)

Date of mailing of the international search report

06 April 2004 (06.04.04)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2003/000635

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> G01N 33/68, 33/576

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

CIP<sup>7</sup> G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, HCAPLUS, GOOGLE

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	SHELLY, C.L. et al. "Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation". PNAS, Vol. 98, n°10, 8 de mayo de 2001, páginas 5560-5565, discusión.	1-8, 14
X	MATO, J.M. et al. "S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. FASEB J. Vol. 16, 2002, páginas 15-26, Figura 3.	1-8, 14
X	ZATLOUKAL, K. et al. "Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis". REV. ESP. PATOL. Vol. 32, n° 3, 1999, páginas 293-294, todo el documento.	1-14
PX	SANTAMARIA, E. et al. "Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: Mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine". PNAS, Vol. 100, n° 6, 18 de marzo de 2003, páginas 3065-3070, todo el documento.	1-14

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:  
 "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.  
 "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.  
 "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).  
 "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.  
 "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.  
 "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.  
 "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.  
 "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

29 Marzo 2004 (29.03.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

06 ABR 2004 06.04.04

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Novoa Sanjurjo

Nº de teléfono + 34 91 3495552

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**